

PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BEHNISCH, Werner
Reinhard-Skühra-Weise & Partner GbR
Friedrichstrasse 31
Postfach 44 01 51
D-80750 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 06 août 2001 (06.08.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference P11700 Dr B/La	
International application No. PCT/EP99/07613	International filing date (day/month/year) 11 octobre 1999 (11.10.99)

1. The following indications appeared on record concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the applicant	<input checked="" type="checkbox"/> the inventor	<input type="checkbox"/> the agent
<input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address RUDOLPH, Rainer Körnerstrasse 37 D-06114 Halle Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
<input checked="" type="checkbox"/> the person	<input checked="" type="checkbox"/> the name	<input checked="" type="checkbox"/> the address
<input type="checkbox"/> the nationality		
<input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address SCIL PROTEINS GMBH Heinrich-Damerow Strasse 01 06120 Halle Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: Applicant indicated in Box 1. has assigned his rights to applicant indicated in Box 2. RUDOLPH, Rainer is now applicant and inventor for US only.		
4. A copy of this notification has been sent to:		
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned	
<input type="checkbox"/> the international Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other	

TENT COOPERATION TRE /

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BEHNISCH, Werner
Reinhard-Skuhra-Weise & Partner GbR
Friedrichstrasse 31
Postfach 44 01 51
D-80750 München
ALLEMAGNEDate of mailing (day/month/year)
12 April 2001 (12.04.01)Applicant's or agent's file reference
P11700 Dr.B/LaInternational application No.
PCT/EP99/07613

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
11 October 1999 (11.10.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

SCIL PROTEINS GMBH
Heinrich-Damerow-Strasse 1
06120 Halle
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Applicants RUDOLPH, Rainer et al have signed their rights to the above mentioned applicant, and therefore are designated as inventor/applicant for US only.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 04 May 2000 (04.05.00)	
International application No. PCT/EP99/07613	Applicant's or agent's file reference P11700 Dr.B/La
International filing date (day/month/year) 11 October 1999 (11.10.99)	Priority date (day/month/year) 09 October 1998 (09.10.98)
Applicant RUDOLPH, Rainer et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

24 March 2000 (24.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

6

Applicant's or agent's file reference P11700 Dr.B/La	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/07613	International filing date (day/month/year) 11 October 1999 (11.10.99)	Priority date (day/month/year) 09 October 1998 (09.10.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant SCIL PROTEINS GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Name and mailing address of the IPEA EP

Authorized officer

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/07613

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages _____ 1-24 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages _____ 1-7 _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____ 8,9 _____, filed with the letter of _____ 20 December 2000 (20.12.2000)
- ☒ the drawings:
 pages _____ 1-8 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
 pages _____ 21-24 _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:
☒ contained in the international application in written form.
☒ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, _____

* Elements of the international application which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** The sequence listing is not annexed.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No
PCT/EP 99/07613

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Reference is made to the following document:

D1: EP-A-0 544 293 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2 June 1993 (1993-06-02), indicated in the application.

Novelty and inventive step, PCT Article 33(2), (3)

The cited prior art does not disclose a process for preparing a biologically active β -NGF from its inactive, poorly soluble proform which can be obtained after recombinant preparation in procaryotes as per Claim 1. Claim 1 and its dependent Claims 2-7 are therefore novel. Even a pharmaceutical preparation containing recombinant proNGF, as described in Claim 8, and the use of recombinant proNGF, as described in Claim 9, could not be derived from the cited prior art. Claims 8 and 9 should therefore also be regarded as novel.

It is further noted that the cited prior art does not disclose a process for preparing a biologically active β -NGF from its inactive, poorly soluble proform which can be obtained after recombinant preparation in procaryotes as per Claim 1.

Examiner's signature

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/EP 99/07613

things, of the mature β -NGF as well as a part of the protein sequence of the β -NGF precursor. The difference between Claim 1 and D1 is therefore that in Claim 1 the proform of β -NGF is used to prepare biologically active β -NGF. Consequently, the problem is to provide an additional process for preparing biologically active β -NGF.

The cited prior art does not offer any suggestion which would induce a person skilled in the art to prepare active β -NGF from its inactive, poorly soluble proform that can be obtained after recombinant preparation in procaryotes as per Claim 1. Claim 1 and its dependent Claims 2-7 therefore appear to be inventive.

Moreover, there is no suggestion which would induce a person skilled in the art to provide a pharmaceutical preparation as per Claim 8 or to use recombinant proNGF as per Claim 9. Claims 8 and 9 should therefore also be regarded as inventive.

new version

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESSENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P11700 Dr.B	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/ 07613	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/10/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/10/1998
Anmelder RUDOLPH, Rainer et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I)

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II)

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt

Folgt die Abbildung der **Zeichnungen** mit der Zusammenfassung zu Lande (siehe Anhang I)

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07613

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/12 K14/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 544 293 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2. Juni 1993 (1993-06-02) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3, Zeile 45 -Seite 4, Zeile 34 Seite 4, Zeile 54 -Seite 5, Zeile 23 Seite 6, Zeile 24 -Seite 7, Zeile 1 ---	1-7
X	EP 0 786 520 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 30. Juli 1997 (1997-07-30) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 9 -Seite 4, Zeile 23 Seite 5, Zeile 16 -Seite 7, Zeile 29 Seite 13, Zeile 39,40 --- -/-	1-7

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

Q Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen

11. Februar 2000

10.03.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt
Postfach 1
D-83446 München
Telefon: 089 36 00-1
Telefax: 089 36 00-4000

Bevollmächtigter Beauftragter

München, 10.03.00

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07613

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ALTERNATIVE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SUTER U. ET AL.: "Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 10, Nr. 9, 1991, Seiten 2395-2400, XP002095460</p> <p>in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2399</p>	
A	<p>--- WO 97 28272 A (TECHNOLOGENE INC. (US); SGARLATO G.D.) 7. August 1997 (1997-08-07) Seite 27, Zeile 24 -Seite 29, Zeile 21 Seite 101, Zeile 11 -Seite 106; Beispiel 6 -----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07613

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0544293	A	02-06-1993	DE	4139000 A	03-06-1993
			AT	158814 T	15-10-1997
			DE	59208942 D	06-11-1997
			EP	0786520 A	30-07-1997
			JP	2637392 B	06-08-1997
			JP	9023883 A	28-01-1997
			JP	2611102 B	21-05-1997
			JP	6327489 A	29-11-1994

EP 0786520	A	30-07-1997	DE	4139000 A	03-06-1993
			AT	158814 T	15-10-1997
			DE	59208942 D	06-11-1997
			EP	0544293 A	02-06-1993
			JP	2637392 B	06-08-1997
			JP	9023883 A	28-01-1997
			JP	2611102 B	21-05-1997
			JP	6327489 A	29-11-1994

WO 9728272	A	07-08-1997	US	5935824 A	10-08-1999
			AU	1847497 A	22-08-1997
			EP	0910658 A	28-04-1999

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 18 JAN 2001

WIPO

PCT

TC

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P11700 Dr.B/La	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07613	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/10/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/10/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12		
Anmelder RUDOLPH, Rainer et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1999-01-01

Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen

Bevollmächtigter Beauftragter



Internationaler Vorläufiger Prüfungsbericht
Formblatt PCT/IPEA/416
1999-01-01



WIPO

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-24 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-7 ursprüngliche Fassung

8,9 eingegangen am 20/12/2000 mit Schreiben vom 20/12/2000

Zeichnungen, Blätter:

1-8 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

21-24, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07613

Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 10.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: EP-A-0 544 293 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2. Juni 1993 (1993-06-02) in der Anmeldung erwähnt

Neuheit und Erfinderischer Schritt, Art. 33(2)(3) PCT

Ein Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven β -NGF aus seiner inaktiven schwer löslichen Proform erhältlich nach rekombinanter Herstellung in Prokaryonten, gemäß Anspruch 1, ist aus dem zitiertem Stand der Technik nicht bekannt. Anspruch 1 sowie die davon abhängigen Ansprüche 2-7 sind daher neu. Auch eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend rekombinanten proNGF, wie in Anspruch 8 beschrieben, sowie die Verwendung von rekombinanten proNGF wie in Anspruch 9 beschrieben konnte dem zitiertem Stand der Technik nicht entnommen werden. Auch Ansprüche 8 und 9 müssen daher als neu angesehen werden.

D1 stellt den für die vorliegende Anmeldung nächsten Stand der Technik dar. Besagtes Dokument (Beispiel 1-8) offenbart die Gewinnung von biologisch aktiven β -NGF aus einem in Prokaryonten rekombinant hergestellten Fusionsprotein enthaltend β -NGF. Besagtes Fusionsprotein besteht unter anderem aus dem reifen β -NGF sowie einem Teil der Pro-Sequenz des β -NGF-Precursors. Der Unterschied zwischen Anspruch 1 und D1 besteht somit darin, daß in Anspruch 1 von der Proform von β -NGF zur Gewinnung biologisch aktiven β -NGF ausgegangen wird. Die Aufgabe besteht daher in der Bereitstellung eines weiteren Verfahrens zur Herstellung von biologisch aktiven β -NGF.

Im zitiertem Stand der Technik findet sich kein Hinweis, der den Fachmann veranlassen

könnte, ein Verfahren zur Gewinnung von biologisch aktiven β -NGF aus der Proform von β -NGF zu entwickeln. Anspruch 1 sowie die davon abhängigen Ansprüche 2-7 scheinen daher erfinderisch.

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT - BEIBLATT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07613

Weiter findet sich kein Hinweis, der den Fachmann veranlassen würde eine pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 8 bereitzustellen oder rekombinanten proNGF gemäß Anspruch 9 zu verwenden. Auch Ansprüche 8 und 9 müssen daher als erfinderisch angesehen werden.

PCT/EP99/07613

Anmelder: RUDOLPH, Rainer et al.

Neue Ansprüche 8 und 9

8. Pharmazeutische Zubereitung,
dadurch gekennzeichnet, daß
sie rekombinanten proNGF als Wirkstoff enthält.
9. Verwendung von rekombinantem proNGF zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Neuropathien.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

REINHARD, SKUHRA, WEISE & PARTNER G
BR
z.H. Behnisch, Werner
Postfach 44 01 51
D-80750 München
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

Eingegangen
Reinhard • Skuhra • Weise
14. März 2000

Frist 10.5.00

Erl.

48.28.3.00

Absenddatum
(Tag/Monat/Jahr)

10/03/2000

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

P11700 Dr.B

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07613

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

11/10/1999

Anmelder

RUDOLPH, Rainer et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.
3. ☐ **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß
- ☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind
- ☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90^{bis} bzw. 90^{ter} vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht.

20 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90^{bis} bzw. 90^{ter} vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder einer nachträglichen Auswanterklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für das Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.



Internationales Patentamt
34, Chemin des Colombettes
CH-1211 Genf 20
Tel. +31 (0) 22 740 14 35
Fax +31 (0) 22 740 14 36

Ministerium für Wirtschaft und Technologie

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsvorschriften zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsvorschriften.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu nummerieren (Verwaltungsvorschriften, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben ist auch dann des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P11700 Dr.B	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%; border: none;">WEITERES VORGEHEN</td> <td style="border: none;">siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5</td> </tr> </table>		WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5			
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 99/07613	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/10/1999	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 09/10/1998		
Anmelder RUDOLPH, Rainer et al.				

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II)

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. —

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ wie von der Beh.

Abb. Nr. —

Abb. Nr. —

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07613

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDEGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/12 C07K14/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 544 293 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2. Juni 1993 (1993-06-02) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3, Zeile 45 -Seite 4, Zeile 34 Seite 4, Zeile 54 -Seite 5, Zeile 23 Seite 6, Zeile 24 -Seite 7, Zeile 1 ---	1-7
X	EP 0 786 520 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 30. Juli 1997 (1997-07-30) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 9 -Seite 4, Zeile 23 Seite 5, Zeile 16 -Seite 7, Zeile 29 Seite 13, Zeile 39,40 --- -/--	1-7



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie angegeben)

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

11. Februar 2000

10.03.00

Boehringer Mannheim AG
Patentabteilung
Postfach 10 15 50
D-6800 Mannheim 1
Tel. +49 621 304 2244
Fax +49 621 340 3016

Macchia, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGEBENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SUTER U. ET AL.: "Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 10, Nr. 9, 1991, Seiten 2395-2400, XP002095460 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2399</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 97 28272 A (TECHNOLOGENE INC. (US); SGARLATO G.D.) 7. August 1997 (1997-08-07) Seite 27, Zeile 24 -Seite 29, Zeile 21 Seite 101, Zeile 11 -Seite 106; Beispiel 6</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/07613

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0544293 A	02-06-1993	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0786520 A	30-07-1997
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994

EP 0786520 A	30-07-1997	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0544293 A	02-06-1993
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994

WO 9728272 A	07-08-1997	US 5935824 A	10-08-1999
		AU 1847497 A	22-08-1997
		EP 0910658 A	28-04-1999

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

BEHNISCH, Werner
REINHARD, SKUHRA, WEISE & PARTNER
Postfach 44 01 51
D-80750 München
ALLEMAGNE

Eingegangen
Reinhard • Skuhra • Weise

17. Jan. 2001

Frist

Erl.

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

16.01.2001

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
P11700 Dr.B/La

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP99/07613

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
11/10/1999

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
09/10/1998

Anmelder

RUDOLPH, Rainer et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P11700 Dr.B/La	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07613	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/10/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 09/10/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/12		
Anmelder RUDOLPH, Rainer et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

24.10.2000



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets
CH-1151 St. Gallen, Suisse
CH-1151 St. Gallen, Schweiz
CH-1151 St. Gallen, Svizzera

Seite 1

Formblatt PCT/IPEA/416



Seite 1

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-24 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-7 ursprüngliche Fassung

8,9 eingegangen am 20/12/2000 mit Schreiben vom 20/12/2000

Zeichnungen, Blätter:

1-8 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

21-24, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/07613

Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: EP-A-0 544 293 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2. Juni 1993 (1993-06-02) in der Anmeldung erwähnt

Neuheit und Erfinderischer Schritt, Art. 33(2)(3) PCT

Ein Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven β -NGF aus seiner inaktiven schwer löslichen Proform erhältlich nach rekombinanter Herstellung in Prokaryonten, gemäß Anspruch 1, ist aus dem zitiertem Stand der Technik nicht bekannt. Anspruch 1 sowie die davon abhängigen Ansprüche 2-7 sind daher neu. Auch eine pharmazeutische Zubereitung enthaltend rekombinanten proNGF, wie in Anspruch 8 beschrieben, sowie die Verwendung von rekombinanten proNGF wie in Anspruch 9 beschrieben konnte dem zitiertem Stand der Technik nicht entnommen werden. Auch Ansprüche 8 und 9 müssen daher als neu angesehen werden.

D1 stellt den für die vorliegende Anmeldung nächsten Stand der Technik dar. Besagtes Dokument (Beispiel 1-8) offenbart die Gewinnung von biologisch aktiven β -NGF aus einem in Prokaryonten rekombinant hergestellten Fusionsprotein enthaltend β -NGF. Besagtes Fusionsprotein besteht unter anderem aus dem reifen β -NGF sowie einem Teil der Pro-Sequenz des β -NGF-Precursors. Der Unterschied zwischen Anspruch 1 und D1 besteht somit darin, daß in Anspruch 1 von der Proform von β -NGF zur Gewinnung biologisch aktiven β -NGF ausgegangen wird. Die Aufgabe besteht daher in der Bereitstellung eines weiteren Verfahrens zur Herstellung von biologisch aktiven β -NGF.

sowie die davon abhängigen Ansprüche 2-7 scheinen daher erfinderisch.

Weiter findet sich kein Hinweis, der den Fachmann veranlassen würde eine pharmazeutische Zubereitung gemäß Anspruch 8 bereitzustellen oder rekombinanten proNGF gemäß Anspruch 9 zu verwenden. Auch Ansprüche 8 und 9 müssen daher als erfinderisch angesehen werden.

PCT/EP99/07613

Anmelder: RUDOLPH, Rainer et al.

Neue Ansprüche 8 und 9

8. Pharmazeutische Zubereitung,
dadurch gekennzeichnet, daß
sie rekombinanten proNGF als Wirkstoff enthält.
9. Verwendung von rekombinatem proNGF zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Neuropathien.



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/12, C07K 14/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/22119 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. April 2000 (20.04.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/07613 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Oktober 1999 (11.10.99) (30) Prioritätsdaten: 98119077.0 9. Oktober 1998 (09.10.98) EP (71)(72) Anmelder und Erfinder: RUDOLPH, Rainer [DE/DE]; Körnerstrasse 37, D-06114 Halle (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): RATTENHOLL, Anke [DE/DE]; Senffstrasse 30, D-06120 Halle (DE). SCHWARZ, Elisabeth [DE/DE]; Körnerstrasse 37, D-06114 Halle (DE). GROSSMANN, Adelbert [DE/DE]; Heimgartenstrasse 1, D-82436 Eglfing (DE). (74) Anwalt: BEHNISCH, Werner; Reinhard-Skühra-Weise & Partner GbR, Friedrichstrasse 31, Postfach 44 01 51, D-80750 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, JP, KR, US, ZA. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: METHOD FOR OBTAINING ACTIVE β -NGF (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEWINNUNG VON AKTIVEM β -NGF (57) Abstract <p>The invention relates to a method for producing biologically active β-NGF from the proform proNGF. After expressing the proform of the β-NGF in a prokaryotic host cell, the recombinant protein is isolated in the form of insoluble inactive aggregates (inclusion bodies). After the solubilization thereof in a strong denaturing agent and the subsequent conversion thereof into the natural conformation, which is determined by the disulfide bridges present in the natural β-NGF, biologically active β-NGF is obtained by subsequently splitting-off the prosequence.</p> (57) Zusammenfassung <p>Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung von biologisch aktivem β-NGF, ausgehend von der Proform proNGF. Nach Expression der Proform des β-NGF in einer prokaryotischen Wirtszelle wird das rekombinante Protein in Form unlöslicher, inaktiver Aggregate (Inclusion Bodies) isoliert. Nach deren Solubilisierung in einem starken Denaturierungsmittel und anschließender Überführung in die natürliche Konformation, die durch die im natürlichen β-NGF vorhandenen Disulfidbrücken bestimmt ist, wird durch anschließende Abspaltung der Prosequenz biologisch aktiver β-NGF gewonnen.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia				

CZ	Tschechien	EC	El Salvador	RU	Russische Föderation
DE	Deutschland	EE	Estland	SD	Sudan
DK	Dänemark	LI	Liechtenstein	SE	Schweden
EE	Estland	LK	Sri Lanka	SG	Singapur
		LR	Liberia		

Verfahren zur Gewinnung von aktivem β -NGF

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Gewinnung von β -NGF durch Naturierung von denaturiertem, inaktiven proNGF und Abspaltung der Prosequenz.

Nervenwachstumsfaktor (β -NGF) ist ein neurotropher Faktor, der für das Wachstum und das Überleben von sympathischen und sensorischen Neuronen notwendig ist (Levi-Montalcini, R., *Science* 237 (1987) 1154; Thoenen, H. et al., *Physiol. Rev.* 60 (1980) 1284; Yankner, B.A. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 845). β -NGF unterstützt außerdem Wachstum, Differenzierung und Vitalität cholinergischer Neuronen des zentralen Nervensystems (Hefti, F.J., *J. Neurobiol.* 25 (1994) 1418). Mögliche therapeutische Indikationen für rekombinanten menschlichen Nervenwachstumsfaktor beinhalten periphere sensorische Neuropathien, z.B. bei Diabetes oder als mögliche Nebenwirkung bei der AIDS-Therapie. Weitere Indikationen für rh- β -NGF stellen zentrale Neuropathien, z.B. die Alzheimersche Krankheit dar. Der Gedächtnisverlust wird hier durch den Verlust cholinergischer Neuronen hervorgerufen.

Menschlicher β -NGF wird als Präpro-Protein translatiert. Dieses besteht aus 241 Aminosäuren. Das Präpeptid (18 Aminosäuren) wird bei der Translokation ins endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten, das entstandene Proprotein wird anschließend N- und C-terminal prozessiert (Abspaltung der Prosequenz (103 Aminosäuren) und der letzten beiden Aminosäuren). Reifer humaner NGF besteht folglich aus 118 Aminosäuren. Er ist homolog zum Maus- β -NGF und unterscheidet sich von diesem Protein lediglich durch 12 Aminosäureaustausche. Für die Durchführung klinischer Studien oder einen möglichen Einsatz als Therapeutikum müssen große Mengen homogenen β -NGFs verfügbar sein. Eine natürliche Quelle größerer Mengen dieses Faktors sind die Submaxillardrüsen männlicher Mäuse. Diese Präparationen sind jedoch heterogene Gemische verschiedener Dimerer und daher für einen therapeutischen Einsatz ungeeignet. Außerdem ist es wünschenswert, Patienten die humane Form des Proteins zu verabreichen. Neurotrophe Faktoren sind aber nur in verschwindend geringen Konzentrationen im menschlichen Gewebe vorhanden.

entweder in Zellkultur oder in Bakterien. Eukaryotische Zellexpressionsysteme liefern jedoch nur sehr geringe Proteinmengen und sind verhältnismäßig teuer (Barnett, J. et al., J.

Neurochem. 57 (1991) 1052; Schmelzer, C.H. et al., J. Neurochem. 59 (1992) 1675; US 5,683,894).

Im Gegensatz dazu werden mit prokaryotischen Expressionssystemen große Mengen des gewünschten Proteins erhalten. Bakterien sind jedoch im Gegensatz zu den eukaryotischen Expressionssystemen nicht in der Lage, die Vorläuferproteine korrekt zu prozessieren. Die Produktion rekombinanten β -NGFs führt in Bakterien, wie häufig bei der Expression von rekombinanten Säugergenen, zum biologisch inaktiven Translationsprodukt, welches dann in aggregierter Form in der Zelle abgelagert wird (sog. „Inclusion Bodies“ (IBs)).

Die Naturierung von reifem β -NGF aus derartigen Inclusion Bodies gelingt jedoch nur bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (unter 10 $\mu\text{g/ml}$) und bei sehr geringen Ausbeuten (bis ca. 10 %). Solche Verfahren sind beispielsweise beschrieben in der EP-A 0 544 293, US-Patent 5,606,031, US-Patent 5,235,043 und WO 97/47735. Eine Naturierung über eine Sulfitylyse von neurotrophen Faktoren der NGF/BDNF-Familie wird in der WO 95/30686 beschrieben.

In der WO 97/47735 wird ein verbessertes Verfahren zur Naturierung von Proteinen beschrieben. In diesem Verfahren wird das inaktive Protein mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration in Gegenwart einer niedermolekularen Substanz, welche Thiolgruppen enthält, gelöst. Das gelöste Protein wird anschließend aus der stark denaturierenden Lösung in eine nicht oder nur schwach denaturierende Lösung überführt, in welcher es eine biologisch aktive Konformation annimmt, wobei die Disulfidbindungen mit der Thiolkomponente gelöst werden und im Protein intramolekular in der Weise neu gebildet werden, daß das Protein eine Konformation einnimmt, die biologische Aktivität aufweist. Mit einem solchen verbesserten Verfahren kann für β -NGF eine Naturierungsausbeute von ca. 10% erhalten werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von β -NGF zur Verfügung zu stellen, welches einfach ist und aktiven NGF in hohen Ausbeuten liefert.

Proform (proNGF) vorzugsweise ernathten ist in Form von Inclusion Bodies nach rekombinanter Herstellung in Prokaryoten, wobei das Verfahren dadurch gekennzeichnet ist,

daß der proNGF in seiner inaktiven schwer löslichen Form mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration gelöst wird, anschließend unter Erhalt der Löslichkeit in eine nicht oder schwach denaturierende Lösung überführt wird und dabei gelöster denaturierter proNGF eine biologisch aktive Konformation annimmt, die durch die im natürlichen NGF vorliegenden Disulfidbrücken bestimmt ist und anschließend die Prosequenz abgespalten wird, wobei aktiver NGF erhalten wird, der isoliert werden kann.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß die Prosequenz bei der Naturierung von inaktivem β -NGF in vitro einen wesentlichen und positiven Einfluß auf das Naturierungsverfahren hat und es erfindungsgemäß möglich ist, die Renaturierung auf einfachste Weise durchzuführen und dabei dennoch bisher nicht gekannte und für möglich gehaltene Ausbeuten an naturiertem, aktiven β -NGF zu erhalten.

Unter „proNGF“ ist β -NGF zu verstehen, welcher am N-Terminus mit seiner Prosequenz verknüpft ist. Erfindungsgemäß kann als Prosequenz entweder die gesamte Prosequenz (US-Patent 5,683,894; Ullrich, A. et al. Nature 303 (1983) 821; SWISS-PROT Protein Sequence Database No. P01138) oder Teile davon, vorzugsweise vollständige Domänen, verwendet werden. Suter et al. (EMBO J. 10 2395 (1991)) haben die in vivo-Funktion des Propeptids von murinem β -NGF hinsichtlich der korrekten Sekretion in einem COS-7-Zellkultursystem näher untersucht. Dazu wurde die Prosequenz in fünf Bereiche eingeteilt. Es wurden Mutanten hergestellt, in denen ein oder mehrere dieser Sequenzen deletiert wurden. Dabei wurde gefunden, daß die Sequenzbereiche mit den Aminosäuren -52 bis -26 („Domäne I“) sowie -6 bis -1 („Domäne II“) für die Expression und Sekretion von biologisch aktivem β -NGF essentiell sind. Domäne I ist wichtig für die Expression, während Domäne II die korrekte proteolytische Prozessierung bewirkt. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß proNGF in analoger Weise wie β -NGF eine Aktivität in vivo zeigt. proNGF kann damit ebenfalls als Therapeutikum verwendet werden.

Inaktiver, schwer löslicher proNGF entsteht bei der Überexpression des Proteins im Cytosol von Prokaryoten. Rekombinant hergestellter proNGF verbleibt dabei in unlöslicher und aggregierter Form im Cytoplasma. Derartige Aggregate von Proteinen, deren Isolierung und Reinigung sind beispielsweise in Marston, F.A., Biochem. J. 240 (1986) 1 beschrieben. Zur

Der Zellaufschluß kann durch übliche Methoden durchgeführt werden, z.B. mittels Ultraschall, Hochdruckdispersion oder Lysozym (Rudolph, R. et al. (1997): Folding proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein Function: A Practical Approach. Oxford University Press, pp. 57-99). Er wird vorzugsweise in einer zur Einstellung eines neutralen bis schwach sauren pH-Werts geeigneten Pufferlösung als Suspensionsmedium durchgeführt, wie z.B. 0.1 mol/l Tris-HCl. Nach Zellaufschluß werden die unlöslichen Bestandteile (Inclusion Bodies) in beliebiger Weise abgetrennt, vorzugsweise durch Abzentrifugieren oder Filtration nach einem oder mehreren Waschrufen, mit Agentien, die IBs nicht zerstören, fremde Zellproteine jedoch möglichst lösen, z.B. Wasser oder Phosphatpuffer, ggf. unter Zusatz milder Detergentien, wie Brij®. Anschließend wird der unlösliche Anteil (Pellet) dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Solubilisierung und Naturierung unterworfen.

Als Denaturierungsmittel wird zweckmäßig ein für die Solubilisierung von Inclusion Body Proteinen üblicherweise verwendetes Denaturierungsmittel eingesetzt. Bevorzugt werden Guanidiniumhydrochlorid und andere Guanidiniumsalze, wie z.B. Thiocyanat sowie Harnstoff oder dessen Derivate, verwendet. Ferner können Gemische dieser Denaturierungsmittel verwendet werden.

Die Konzentration des Denaturierungsmittels ist von der Art des Denaturierungsmittels abhängig und für einen Fachmann ohne weiteres feststellbar. Die Konzentration des Denaturierungsmittels (denaturierende Konzentration) ist dann ausreichend, wenn eine vollständige Solubilisierung des denaturierten schwer löslichen Proteins erreicht werden kann. Für Guanidiniumhydrochlorid liegen diese Konzentrationen üblicherweise bei 3-8 mol/l, vorzugsweise 5 - 7 mol/l. Für Harnstoff liegen die Konzentrationen üblicherweise bei 6-10 mol/l. Unter einer schwach denaturierenden Lösung ist eine Lösung zu verstehen, welche ein Denaturierungsmittel in einer Konzentration enthält, welche die Verknüpfung der korrekten Disulfidbrücken im Protein und damit die Ausbildung der natürlichen Tertiärstruktur des Proteins ermöglicht. Vorzugsweise unterscheiden sich stark und schwach denaturierende Lösungen in der Konzentration um den Faktor 100 oder mehr.

Zur vollständigen Monomerisierung der Inclusion Body Proteine ist es weiterhin vorteilhaft, während der Solubilisierung zusätzlich ein Reduktionsmittel wie Dithiothreitol (DTT),

Nach der Solubilisierung wird vorzugsweise gegen eine Lösung, welche ein Denaturierungsmittel in einer denaturierenden Konzentration enthält, dialysiert, um ggf. eingesetztes Reduktionsmittel zu entfernen. Zweckmäßig enthält die Lösung, gegen die dialysiert wird, das Denaturierungsmittel in der gleichen Konzentration wie die Denaturierungslösung.

Die anschließende Naturierung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird im neutralen bis alkalischen pH-Bereich durchgeführt, vorzugsweise zwischen pH 7 und 10, besonders bevorzugt im pH-Bereich zwischen 7.5 und 9.5. Als Pufferlösungen sind alle üblichen Puffer geeignet. Vorzugsweise werden dem Fachmann bekannte Puffer, wie z.B. Tris- oder Phosphatpuffer, als Renaturierungspuffer verwendet. Zur Überführung des denaturierten Proteins in Renaturierungspuffer wird das solubilisierete Protein in den Renaturierungspuffer verdünnt oder gegen Renaturierungspuffer dialysiert. Dadurch wird das Denaturierungsmittel ebenfalls in seiner Konzentration so weit verdünnt (schwach denaturierende Lösung), daß eine weitere Denaturierung des Proteins nicht mehr erfolgt. Bereits während der anfänglichen Erniedrigung der Konzentration des Denaturierungsmittels kann ein Naturierungsprozeß erfolgen. Die Bedingungen für die Überführung des Proteins in die nicht oder schwach denaturierende Lösung müssen so gewählt sein, daß das Protein im wesentlichen in Lösung bleibt. Zweckmäßig kann dies durch eine langsame kontinuierliche oder eine schrittweise Verdünnung erfolgen. Dabei ist es bevorzugt, das Denaturierungsmittel so zu verdünnen, daß eine möglichst vollständige Naturierung des Proteins erfolgt, oder das Denaturierungsmittel beispielsweise durch Dialyse nahezu vollständig zu entfernen.

Die Naturierung erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von niedermolekularen Hilfsstoffen, welche die Ausbeute bei der Naturierung positiv beeinflussen. Derartige Hilfsstoffe sind beispielsweise in US-Patent 5,593,865 beschrieben. Besonders bevorzugt wird als niedermolekularer Hilfsstoff bei der Naturierung Arginin verwendet, zweckmäßig in einer Konzentration von 0.2 bis 1.5 M.

Die Naturierung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt vorzugsweise unter Zusatz einer Thiolkomponente in reduzierter und oxidiert Form. Bevorzugte Thiolkomponenten sind z.B. Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidiert Form (GSSG), Cystamin und Cystamin, Cystein und Cystin oder 2-Mercaptoethanol und 2-Hydroxyethyl-disulfid. Zusatz

von Thiolkomponenten ist vorteilhaft, da Thiole die Disulfidbrücken zwischen den Aminosäureketten aufbrechen und so die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Aminosäureketten verhindern.

Nach dem "Reshuffling" zwischen Disulfidbrücken (Cys-Cys) und zwischen den sich findenden Polypeptidketten (Rudolph et al. 1997, loc. cit.)

Das erfindungsgemäße Verfahren wird zweckmäßig während der Naturierung bei niederen Temperaturen (vorzugsweise ca. 10°C) durchgeführt. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die Renaturierung während einer Dauer von 0.5-5 h, bevorzugt von 1-2 h, durchgeführt.

Zur Verhinderung der Oxidation des Reduktionsmittels durch Luftsauerstoff und zum Schutz freier SH-Gruppen ist es zweckmäßig, einen Komplexbildner, wie EDTA, vorzugsweise in einer Menge von 1-20 mM, besonders bevorzugt um ca. 10 mM zuzusetzen.

Unter der „Aktivität von β -NGF“ ist die biologische Aktivität von β -NGF zu verstehen. Biologisch aktiver β -NGF liegt als Dimer vor. Die Aktivität kann bestimmt werden nach dem DRG-Test (Dorsal Root Ganglionassay), Levi-Montalcini, R. et al., Cancer Res. 14 (1954) 49 und Varon, S. et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203. Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien aus Hühnerembryonen an Hand der Ausbildung von Neuriten untersucht.

Die Prosequenz stellt eine vom reifen Protein getrennte Domäne dar. Zwischen diesen Domänen befindet sich eine exponierte Proteasespaltstelle. Diese Spaltstellen lassen sich spezifisch mit geeigneten Proteasen schneiden. Trypsin beispielsweise schneidet nach basischen Aminosäuren wie Lysin oder Arginin. In einem geeigneten Verhältnis von proNGF zu Trypsin wird das korrekt gefaltete, mature Protein nicht von der Protease abgebaut. Denaturierte Proteine und auch Faltungsintermediate hingegen exponieren Sequenzen, die dem Angriff der Protease erliegen. Für die Prozessierung von proNGF werden Proteasen mit Trypsin-ähnlicher Substratspezifität bevorzugt. Diese Proteasen spalten das Protein, ohne den aktiven Teil des Proteinmoleküls abzubauen. Als Trypsin-ähnliche Proteasen kommen verschiedene Serin-Proteasen (z.B. Trypsin selbst oder γ -NGF) in Frage. Bevorzugt wird Trypsin eingesetzt. Für die limitierte Proteolyse wird das Protein in einem Masse-Verhältnis von 1:40 bis 1:2500 (Verhältnis Trypsin : proNGF) eingesetzt, bevorzugt wird ein Bereich von 1:40 bis 1:250. Die Proteolyse wird mit einer Inkubationszeit von 1 min - 24 h, bevorzugt 1 - 60 min bei einer Temperatur von 0°C bis 37°C, bevorzugt 0°C bis 20°C, durchgeführt. Als Puffer werden solche verwendet, die die Aktivität der Protease nicht hemmen. Bevorzugt sind Phosphat- und Tris-Puffer im Konzentrationsbereich von 10-100 mM. Die limitierte Proteolyse wird im

spezifischen Inhibitor (bevorzugt 10 mM PMSF (Phenylmethanesulfonylfluorid) oder Sojabohnen-Trypsininhibitor, bevorzugt 1 mg auf 0.1-5 mg Trypsin oder durch Erniedrigung

des pH-Werts auf pH 2-3 durch Zugabe von Säure, bevorzugt HCl (Rudolph, R. et al. (1997): Folding proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein Function: A Practical Approach. Oxford University Press, pp. 57-99, US Patent 5,683,894).

Die folgenden Beispiele, Publikationen und Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Figur 1 zeigt das proNGF-Plasmidkonstrukt pET11a-proNGF für die Expression von rekombinantem humanen proNGF.

Figur 2 zeigt eine Coomassie-Färbung eines SDS-PAGE-Gels (15 %) mit Rohextrakten des E. coli-Stammes BL21(DE3) pET11a-proNGF/pUBS520 vor bzw. nach Induktion sowie einer IB-Präparation (SDS-PAGE nach Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680). U: Rohextrakt vor Induktion, I: Rohextrakt nach vierstündiger Induktion, P: IB-Pellet, S: löslicher Überstand).

Figur 2a zeigt den Einfluß des pH-Werts auf die Faltung von rh-proNGF bei 10°C in 100 mM Tris/HCl, 1 M L-Arginin, 5 mM GSH, 1 mM GSSG, 5 mM EDTA. Die Proteinkonzentration betrug 50 µg/ml, die Faltungsdauer 3 Stunden. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.

Figur 2b stellt den Effekt unterschiedlicher L-Arginin-Konzentrationen auf die Faltung von rhpro-NGF dar. Es wurde bei einem pH-Wert von 9.5 renaturiert; die übrigen Bedingungen waren identisch mit denen der bei der pH-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.

Figur 2c zeigt den Einfluß verschiedener GSH-Konzentrationen auf die Faltung von rh-pro-NGF. Die GSSG-Konzentration betrug 1 mM, die L-Arginin-Kon-

zentration betrug 1 M.

Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.

- Figur 2d** zeigt den Einfluß verschiedener GSSG-Konzentrationen auf die Renaturierung von rh-proNGF. Die GSH-Konzentration betrug 5 mM. Die restlichen Faltungsparameter waren identisch mit denen bei der GSH-Variation verwendeten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.
- Figur 2e** stellt den Einfluß verschiedener GdmCl-Gehalte auf die Ausbeute von nativem rh-proNGF dar. Der Gehalt an GSH bzw. GSSG betrug 5 mM bzw. 0.5 mM. Die anderen Renaturierungsbedingungen waren identisch mit denen bei der GSSG-Variation benutzten. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus zwei Meßreihen.
- Figur 2f** zeigt den Effekt unterschiedlicher Proteinkonzentrationen auf die Faltungsausbeute von rh-proNGF. Die GdmCl-Konzentration betrug in allen Ansätzen 200 mM. Alle anderen Faltungsparameter waren identisch mit denen bei der GdmCl-Variation verwendeten. Dargestellt ist eine Meßreihe.
- Figur 3** zeigt das Elutionsprofil der Reinigung von rh-proNGF mittels Kationenaustauschchromatographie an Poros 20 HS (Perseptive Biosystems, Säulenvolumen 1.7 ml).
- Figur 4** zeigt ein SDS-PAGE-Gel (15 %, Silberfärbung nach Nesterenko, M.V. et al., J. Biochem. Biophys. Methods 28 (1994) 239) der Reinigung von rh-proNGF an Poros 20 HS (1: Auftrag rh-proNGF-Renaturat, 2: Durchlauf, 3: Fraktion 4 (66 bis 69 ml), 4: Fraktion 5 (69-72 ml), 5: Fraktion 6 (72-75 ml), 6: Fraktion 7 (75-78 ml), 7: Fraktion 8 (78-81 ml), 8: Fraktion 9 (81-84 ml), 9: Fraktion 10 (84-87 ml)).
- Figur 5** zeigt das UV-Spektrum von rh-proNGF.
- Figur 6** zeigt ein IEX-HPLC-Elutionsdiagramm von rh-proNGF (Säulenmaterial: Poros 20 HS, 100 mm x 4.6 mm Säule, Fa. Perseptive Biosystems).

Fig. 6: IEX-HPLC-Elutionsdiagramm von rh-proNGF bei 220 nm (Säule

Figur 8 zeigt ein SDS-Gel (15 % Coomassie-Färbung) der limitierten Proteolyse von rh-proNGF mit Trypsin (M: 10 kDa-Marker, 1: rh-proNGF-Standard, 2: rh- β -NGF-Standard, 3: Masseverhältnis Trypsin : rh-proNGF = 1 : 40, 4: 1 : 100, 5: 1 : 250, 6: 1 : 500, 7: 1 : 1000, 8: 1 : 2000, 9: 1 : 2500, 10: Kontrolle ohne Trypsin, mit STI).

SEQ ID NO: 1 und 2 zeigen Oligonukleotide zur Konstruktion von pET11a-proNGF.

SEQ ID NO: 3 zeigt die Nukleotidsequenz der cDNA von humanem proNGF sowie die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

SEQ ID NO: 4 zeigt die Aminosäuresequenz des Translationsprodukts.

Beispiel 1

Klonierung der proNGF-cDNA in einen Escherichia coli-Expressionsvektor

Für die Klonierung des proNGF-Konstrukts wurde das T7-Expressionssystem von Novagen gewählt (Studier, F.U. et al., J. Mol. Biol. 189 (1986) 113). Die für proNGF codierende DNA-Sequenz steht unter der Kontrolle des starken T7 Transkriptionssignals. Als Wirtstamm wird E. coli BL21 (DE3) verwendet. Das Chromosom enthält das Gen für die T7 RNA-Polymerase. Die Expression dieser RNA-Polymerase und damit des rh-proNGFs wird durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) induziert.

Die cDNA für humanen proNGF wurde durch PCR-Amplifikation aus dem Vektor pMGL-SIG-proNGF von Boehringer Mannheim erhalten (PL-Nr. 1905). Durch Mutageneseprimer wurde am 5'-Ende der für proNGF codierenden DNA-Sequenz eine NdeI- und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde in die NdeI/BamHI-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Vektors pET11a (Novagen) inseriert (Fig. 1).

Es wurden folgende Primer für die PCR benutzt:

Forward Primer „FwProNGF“:

Reverse Primer „RevNGF,,:

5'- CC G GA TCC TTA TCA TCT CAC AGC CTT TCT AGA-3' (SEQ ID NO 2)
Stop Stop Arg Val Ala Lys Arg Ser

Nach der Klonierung in den Vektor wurde die Nucleotidsequenz mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Beispiel 2

a) Expression von humanem proNGF in E. coli

Für die Anzucht des rekombinanten Bakterienstamms wurde eine Übernachtskultur bereitet. Dazu wurde ein geeignetes Volumen LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin versetzt.

LB-Medium (1 l): 10 g Trypton,
10 g Hefeextrakt,
5 g NaCl.

Das Medium wurde mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Am nächsten Morgen wurde das gewünschte Volumen 2×YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin im Verhältnis 1:100 (v/v) mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37°C und 200-250 rpm geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0.5-0.8 erreicht war. Danach wurde die Expression von proNGF mit 3 mM IPTG 4 h lang bei gleicher Temperatur induziert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und entweder sofort aufgeschlossen oder bei -70°C eingefroren.

2×YT-Medium (1 l): 17 g Trypton,
10 g Hefeextrakt,
5 g NaCl.

b) Isolierung der IBs

Das rekombinante Protein fällt in den Bakterienzellen in aggregierter Form an. Die Präparation dieser „Inclusion Bodies“ wurde durchgeführt nach Rudolph, R. et al. (1987): Folding Proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99.

Für den Zellaufschluß wurden jeweils 5 g Zellpellet in 25 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 1 mM EDTA resuspendiert. Danach wurden 1.5 mg Lysozym pro g Zellfeuchtmasse hinzugegeben, 30 min bei 4°C inkubiert und die Zellen anschließend mit dem Gaulin-Zellaufschlußgerät aufgebrochen. Dann wurden 3 mM MgCl₂ sowie 10 µg/ml DNase zum Rohhomogenat gegeben und 30 min bei 25°C inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurden die unlöslichen Zellbestandteile durch Zugabe von 0.5 Volumenanteilen 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1.5 M NaCl pH 7.0 und anschließende dreißigminütige Inkubation bei 4°C solubilisiert. Die IBs wurden 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Sie wurden dann noch viermal mit je 100 ml 100 mM Tris/HCl pH 7.0; 20 mM EDTA gewaschen und bei -20°C aufbewahrt.

Aus 10 l E. coli-Kultur (ca. 44 g Zellfeuchtmasse) wurden auf diese Weise reproduzierbar ca. 4 g IB-Pellet erhalten. Die Präparationen enthielten stets etwa 90-95% rh-proNGF (Fig. 2).

Beispiel 3

a) Solubilisierung der IBs

400 mg IB-Pellet wurden in 2 ml Solubilisierungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0; 6 M GdmCl; 100 mM DTT; 10 mM EDTA) suspendiert, 2 h bei 25°C inkubiert und 30 min bei 13.000 rpm im Kühlraum abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit 1 M HCl auf pH 3-4 gebracht. Das Solubilisat wurde dreimal gegen 300 ml 6 M GdmCl pH 4.0; 10 mM EDTA dialysiert, und zwar zweimal je 2 h bei 25°C und einmal über Nacht im Kühlraum (12°C; 16-18 h). Die Proteinkonzentration wurde dann nach der Bradford-Methode bestimmt (Bradford, M.M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248). Die Konzentration an rh-proNGF betrug zwischen 40 und 50 mg/ml.

Die Darstellung von biologisch aktivem rh-proNGF aus dem Beispiel 3a) hergestellten Solubilisaten wurden diese in verschiedene Renaturierungspuffer verdünnt. Zur Ermittlung der

optimalen Faltungsbedingungen wurden folgende Parameter in der angegebenen Reihenfolge variiert:

- a) Temperatur und Zeit,
- b) pH-Wert,
- c) Arginin-Konzentration,
- d) GSH/GSSG-Konzentration,
- e) GdmCl-Konzentration,
- f) Proteinkonzentration.

Die Ergebnisse sind in Tabellen 1-2 sowie Fig. 2a-f dargestellt. Die Menge an renaturiertem rh-proNGF in den Faltungsansätzen wurde mit RP-HPLC bestimmt. Dazu wurden zu bestimmten Zeiten je 925 µl der Faltungsansätze mit 75 µl 32%iger HCl versetzt und dadurch die Faltungsreaktion gestoppt. Für die RP-HPLC-Analytik wurde eine Poros 10 R1-HPLC-Säule und das HPLC-System Beckman Gold mit 125NM Solvent Module, 168 Detektor, Autosampler 507 und Auswertesoftware „Gold V 8.10“ verwendet. Die erhaltenen Elutionspeaks wurden mit dem Programm „Peakfit“, Version 2.01, gefittet. Zur quantitativen Bestimmung der Ausbeuten wurde eine Eichgerade mit gereinigtem, nativen rh-proNGF erstellt. Da die rh-proNGF-IBs sehr sauber waren, wurde bei der quantitativen Auswertung die zur Renaturierung eingesetzte Gesamtproteinmenge mit der von rh-pro-NGF gleichgesetzt. Bei den dargestellten Meßergebnissen handelt es sich um Durchschnittswerte aus je zwei Messungen.

Tabelle 1

Optimierung von Temperatur und Zeit bei der rh-pro-NGF-Faltung. Die Proteinkonzentration betrug in jedem Renaturierungsansatz 50 µg/ml. Der Faltungspuffer bestand aus

100 mM Tris/HCl pH 9.5,
1 M L-Arginin,
5 mM GSH,
1 mM GSSG,
5 mM EDTA.

Die Meßreihen wurden mehrfach durchgeführt und mit einer Exponentialfunktion gefittet. Dargestellt sind die Durchschnittsergebnisse zweier Messungen.

Temperatur [°C]	Endausbeute [%]	Plateau erreicht nach ca.	Geschwindigkeits- konstante k [s ⁻¹]
4	25.8	3.3 h	$2.596 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
10	29.0	1.6 h	$4.865 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
15	22.4	1.1 h	$6.399 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
20	12.0	1.0h	$1.065 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
25	11.4	0.8 h	$1.935 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Tabelle 2

Hier ist der Einfluß verschiedener GSH/GSSG (GSH = reduziertes Glutathion, GSSG = oxidiertes Glutathion) auf die Faltung von rh-proNGF dargestellt. Als Renaturierungspuffer wurde

100 mM Tris/HCl pH 9.5,
1 M L-Arginin,
5 mM EDTA

verwendet. Die Faltungsdauer betrug 3 h bei 10°C. In der Tabelle sind die einzelnen Faltungsansätze nach abnehmender Ausbeute geordnet. Angegeben sind die durchschnittlichen Ausbeuten aus zwei Meßreihen.

Nr. des Ansatzes	GSH/GSSG-Verhältnis [mM]	Ausbeute [%]
1	5/0.5	37.7
2	5/1	35.0
3	5/5	34.0
4	5/2.5	33.1
5	1/1	29.4
6	5/10	27.6
7	5/20	26.0
8	2.5/1	22.1
9	10/1	21.2
10	1/5	18.9
11	20/1	10.9
12	0/1	9.85
13	0/0	0
14	5/0	0

c) Renaturierung von rh-proNGF im präparativen Maßstab

Rh-proNGF wurde durch Verdünnung in Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl pH 9.5; 1 M L-Arginin; 5 mM GSH; 0.5 mM GSSG; 5 mM EDTA) renaturiert. Dabei wurde bei einer Proteinkonzentration von 50 µg/ml gefaltet. Der Renaturierungsansatz wurde 3 h bei 10°C inkubiert.

d) Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie

Das Renaturat wurde gegen 10 l 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA (IEX-Puffer A) dialysiert und 30 min bei 20000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Poros 20 HS-Säule (1.7 ml) aufgetragen und mit einem linearen Salzgradienten eluiert (IEX-Puffer B: 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 M NaCl; 1 mM EDTA). Das Protein eluiert bei 980 mM NaCl (Fig. 3). Nicht nativer rh-proNGF läßt sich nur unter denaturierenden Bedingungen von der Säule entfernen.

Beispiel 4**Charakterisierung von rh-proNGF****a) Konzentrations- und Molekulargewichtsbestimmung mit UV-Spektralphotometrie**

Zur Konzentrationsbestimmung von rh-proNGF in den gereinigten Proben wurde ein UV-Spektrum von 240 bis 340 nm von gegen 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA dialysierten Proben gemessen (Fig. 5; das Spektrum wurde aufgenommen mit einem Beckman DU 640 Spectrophotometer). Die rh-proNGF-Konzentration der Probe wurde aus der Absorption bei 280 nm bestimmt. Für die Berechnung wurde ein theoretischer molarer Extinktionskoeffizient von 25680 l/(mol×cm) (berechnet nach Gill, S.C. et al., Anal. Biochem. 182 (1989) 319) und das Molekulargewicht von 24869 Da pro Monomer (berechnet mit dem ExPASy-Programm „pI/Mw“ und korrigiert für drei Disulfidbrücken) zugrundegelegt. Die durch das Spektrum ermittelten Werte stimmten gut mit den durch die Bradford-Methode bestimmten Konzentrationen überein. Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mittels Elektrospray-Massenspektrometrie. Die theoretische Masse von rekombinantem proNGF beträgt 24869 Da. Experimentell wurden 24871 Da erhalten.

b) Reinheitsanalyse und Molekulargewichtsbestimmung mit SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurden 15%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Proben enthielten jeweils 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol. Rekombinanter humaner proNGF zeigt im SDS-Gel ein etwas höheres apparentes Molekulargewicht als erwartet: ca. 30 kDa (statt 24.8 kDa) (Fig. 2).

c) Reinheitsanalyse mit IEX-HPLC

24 µg (50 µl einer Probe mit 0.48 mg/ml rh-proNGF) Protein wurden auf eine mit 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 1 mM EDTA äquilibrierte Poros 20 HS-Säule aufgetragen (125 × 4 mm) und bei einer Flußrate von 5 ml/min mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % B (B = 50 mM Na-Phosphat pH 7.0; 2 M NaCl; 1 mM EDTA) in 10 Minuten eluiert (Fig. 6). Zur

d) Reinheitsanalyse mit RP-C4-HPLC

3.1 µg rh-proNGF (15 µl rh-proNGF mit einer Konzentration von 0.21 mg/ml) wurden auf eine mit 0.13% (v/v) TFA äquilibrierte Poros 10 R1-Säule (100 mm × 4.6 mm; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Protein wurde bei einer Flußrate von 0.8 ml/min mit einem nicht-linearen Gradienten innerhalb von 33 min eluiert (0-4 min: 6%B; 4-9 min: 6-30%B; 9-24 min: 30-69%B; 24-25 min: 69-100%B; 25-30 min: 100%B). Als Laufmittel B wurde 0.1% (v/v) TFA in 80% (v/v) Acetonitril verwendet. Zur Detektion wurde die Absorption bei 220 nm herangezogen (Beckman „Gold“-HPLC-System mit Auswertesoftware „Gold V 8.10“). Nativer rh-proNGF eluierte in einem einzigen Peak bei einer Retentionszeit von 14.28 min (Fig. 7).

e) N-terminale Sequenzanalyse

Für die N-terminale Sequenzanalyse wurden die mittels RP-HPLC grob gereinigten, solubilierten IBs verwendet. Die N-terminale Sequenz wurde mit einem Applied Biosystems 476A Protein Sequencer bestimmt. Es wurde folgende Aminosäuresequenz erhalten:

H₂N-Met-Glu-Pro-His-Ser-Glu-Ser-Asn-Val

f) Biologische Aktivität des rekombinanten humanen proNGF

Die physiologische Aktivität von rh-proNGF wurde mit dem DRG-Test (= dorsal root ganglion assay) überprüft (Levi-Montalcini, R. et al. Cancer Res. 14 (1954) 49; Varon, S. et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203). Dabei wird die Stimulierbarkeit und das Überleben von sensorischen Neuronen aus dissoziierten Dorsalwurzelganglien von 7-8 Tage alten Hühnerembryonen anhand der Ausbildung von Neuriten untersucht. Die rh-proNGF-Probe wurde mit Kulturmedium auf Konzentrationen von 0.019 bis 20.00 ng/ml eingestellt. Es wurden 15000 Neuronen pro Testansatz eingesetzt. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt. Als Referenz wurde eine Lösung von rh-β-NGF mit bekannter Konzentration hinzugezogen. Bei der quantitativen Auswertung bezieht man sich auf den sogenannten EC₅₀-Wert, d.h. derjenigen NGF-Konzentration, bei der die

SEITE 1 VON 1

so ergibt sich für reifen rh- β -NGF eine etwa doppelt so große biologische Aktivität wie für rh-proNGF.

Beispiel 5

a) Gewinnung von biologisch aktivem, reifen rh- β -NGF durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF

Menschlicher proNGF besitzt als letzte Aminosäure der Prosequenz ein Arginin. Daher kann in vitro aus dieser Vorstufe durch limitierte Proteolyse mit Proteasen geeigneter Substratspezifität wie beispielsweise Trypsin reifer rh- β -NGF erhalten werden.

500 μ l gereinigter rh-proNGF wurde gegen 50 mM Tris/HCl pH 8.0 dialysiert. Nach der Dialyse wurde mittels Aufnahme des UV-Spektrums eine Proteinkonzentration von 0.49 mg/ml gemessen. Pro Verdau-Ansatz wurden 20 μ g proNGF eingesetzt. Davon wurden nach der Proteolyse 3 μ g (entspricht 6 μ l) mittels SDS-PAGE analysiert. Als Trypsin-Stamm-lösungen wurden 0.1 μ g/ml bzw. 0.01 μ g/ml verwendet. Die Konzentration des Sojabohnen-Trypsin-Inhibitors (STI) betrug 1 mg/ml. Beide Proteine lagen als Lyophilisate vor (Hersteller: Boehringer Mannheim bzw. Sigma) und wurden in obigem Puffer gelöst.

Für die limitierte Proteolyse wurden unterschiedliche Trypsin/rh-proNGF-Masseverhältnisse eingesetzt (s. Tabelle 3). Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurde die Reaktion mit je 5 μ g STI abgestoppt. Als Kontrolle wurde rh-proNGF ohne Zugabe von Protease ebenfalls auf Eis inkubiert und anschließend mit STI versetzt.

Tabelle 3

Verhältnis Trypsin:rh-proNGF	M(Trypsin) [µg]	V(Trypsin) [µl]	V(rh-proNGF) [µl]	V(STI) [µl]
1 : 40	0.5	5 (0.1 µg/ml)	40	5
1 : 100	0.2	2 (0.1 µg/ml)	40	5
1 : 250	0.08	0.8 (0.1 µg/ml)	40	5
1 : 500	0.04	4 (0.01 µg/ml)	40	5
1 : 1000	0.02	2 (0.01 µg/ml)	40	5
1 : 2000	0.01	1 (0.01 µg/ml)	40	5
1 : 2500	0.008	0.8 (0.01 µg/ml)	40	5
Kontrolle	-	-	20	2.5

g) Analyse der Spaltprodukte durch N-terminale Sequenzierung

Die Verdauansätze mit einem Massenverhältnis Trypsin : rh-proNGF von a) 1 : 40; b) 1 : 100 und c) 1 : 250 wurden durch N-terminale Sequenzierung näher untersucht. In der Bande bei 13 kDa fanden sich mehrere Spezies (Figur 8):

N-Terminus 1: Met⁻¹⁰⁴....;

N-Terminus 2: Val⁻³⁵....;

N-Terminus 3: Ser¹...(reifer rh-β-NGF);

N-Terminus 4: Gly¹⁰....

Diese Peptide waren in den verschiedenen Ansätzen in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden.

Ansatz a): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 : N-Terminus 4 = 4 : 5 : 2.

Ansatz b): N-Terminus 2 : N-Terminus 3 = 1 : 1; N-Terminus 4 in Spuren.

Ansatz c) wurde zusätzlich mittels RP-C3-HPLC analysiert (Säule: Nucleosil 500-5 C3-PPN; 125mm x 4 mm). Dabei fanden sich zwei Peaks: Peak 1 (12.32 min): N-Terminus 1; Peak 2 (14.88 min): N-Terminus 2 und N-Terminus 3 im Verhältnis 2 : 3.

mg rh-proNGF (in 50 mM Tris.HCl pH 7.4, Konzentration: 1 µg/ml) im Wasser/ethanol-Verhältnis 1:250 (Trypsin : rh-proNGF) mit Trypsin versetzt. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert.

Danach wurde die Protease mit einem 40-fachen Masseüberschuß an Sojabohnen-Trypsin-inhibitor desaktiviert. Der Spaltansatz wurde gegen 50 mM Natriumphosphat pH 7.0; 1 mM EDTA dialysiert und anschließend auf eine Kationen-Austauschersäule (1.7 ml Poros 20 HS; Perseptive Biosystems) aufgetragen. Das Spaltprodukt eluierte in einem einzigen Peak in einem linearen Salzgradienten von 0 bis 2 M NaCl. Die Elution bei einer Salzkonzentration von etwa 840 mM NaCl entsprach derjenigen von maturem rh- β -NGF in einem Kontrollexperiment. Die Ausbeute an gereinigtem Spaltprodukt betrug 17%.

Die biologische Aktivität des gereinigten Spaltprodukts wurde mittels DRG-Assay getestet. Diese stimmte mit der Aktivität von reifem rh- β -NGF überein (Tab. 4).

Tabelle 4

Spezies	EC ₅₀ -Wert [pg/ml]
rh- β -NGF	110
rh- β -NGF, hergestellt durch limitierte Proteolyse von rh-proNGF	171

Referenzliste

- Barnett, J. et al., J. Neurochem. 57 (1991) 1052
 Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248
 EP-A 0 544 293
 Hefti, F. J., J. Neurobiol. 25 (1994) 1418
 Hill, S. C. et al., Anal. Biochem. 182 (1989) 319
 Laemmli, U. K., Nature 227 (1970) 680
 Levi-Montalcini, R. et al., Cancer Res. 14 (1954) 49
 Levi-Montalcini, R., Science 237 (1987) 1154
 Marston, F.A., Biochem. J. 240 (1986) 1
 Nesterenko, M. V. et al., J. Biochem. Biophys. Methods 28 (1994) 239
 Rudolph, R. et al. (1997): Folding Proteins. In: Creighton, T.E. (ed.): Protein function: A Practical Approach, pp. 57-99

Interf. J. (1997) EMBO J. 16 (1997) 2395

SWISS-PROT Protein Sequence Database No. P01138

- Thoenen, H. et al., *Physiol. Rev.* 60 (1980) 1284
Ullrich, A. et al., *Nature* 303 (1983) 821
US-Patent 5,235,043
US-Patent 5,593,856
US-Patent 5,606,031
US-Patent 5,683,894
Varon, S. et al., *Meth. in Neurochemistry* 3 (1972) 203
WO 97/47735
Yankner, B. A. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 51 (1982) 845

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines biologisch aktiven β -NGF aus seiner inaktiven schwer löslichen Proform, erhältlich nach rekombinanter Herstellung in Prokaryonten, dadurch gekennzeichnet, daß proNGF in seiner inaktiven schwer löslichen Form mit einer Lösung eines Denaturierungsmittels in einer denaturierenden Konzentration gelöst wird, anschließend unter Erhalt der Löslichkeit in eine nicht oder schwach denaturierende Lösung überführt wird und dabei denaturierter proNGF eine biologisch aktive Konformation annimmt, die durch die im natürlichen β -NGF vorliegenden Disulfidbrücken bestimmt ist, und anschließend die Pro-Sequenz abgespalten wird, wobei aktiver β -NGF erhalten wird, der isoliert werden kann.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht oder schwach denaturierende Lösung Arginin enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Arginin- Konzentration 0,2 bis 1,5 mol/l beträgt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Naturierung in Gegenwart einer Thiolkomponente in reduzierter und oxidierter Form erfolgt.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Abspaltung der Pro-Sequenz durch eine Protease erfolgt, welche eine Substratspezifität zur Spaltung nach der Aminosäure Arginin besitzt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Protease Trypsin verwendet wird.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Denaturierungsmittel Guanidiniumhydrochlorid oder Harnstoff verwendet wird.

Fig. 1

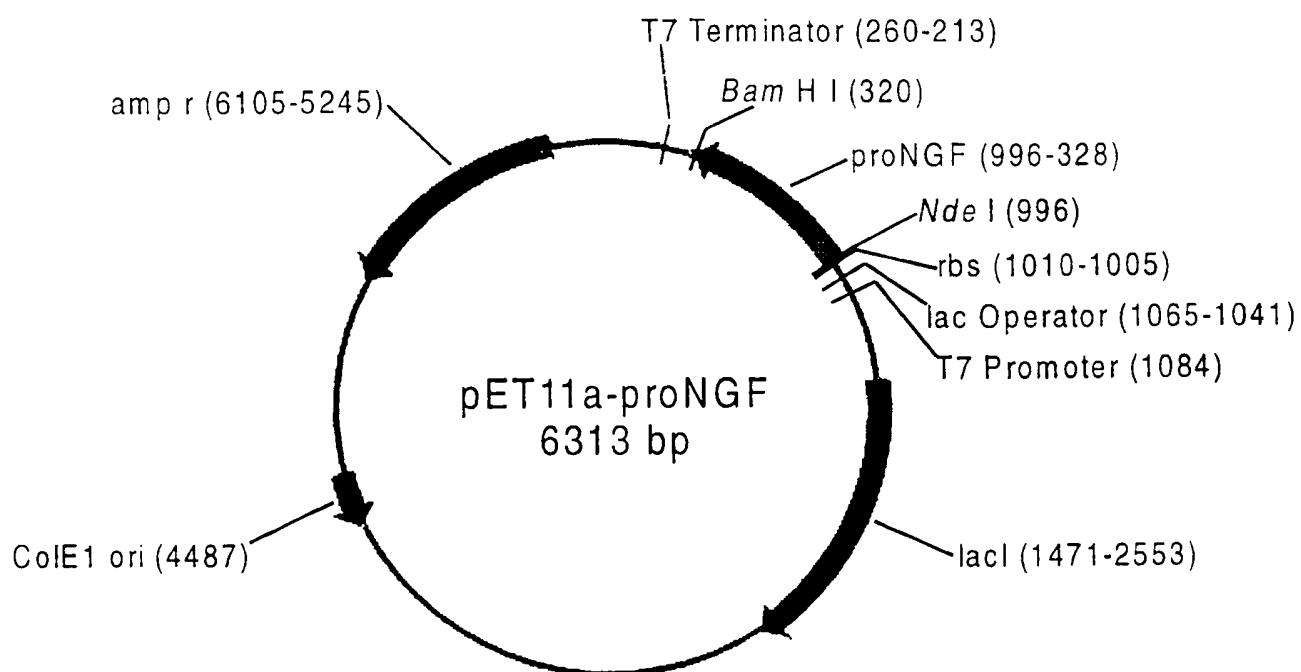


Fig. 2



Fig. 2a

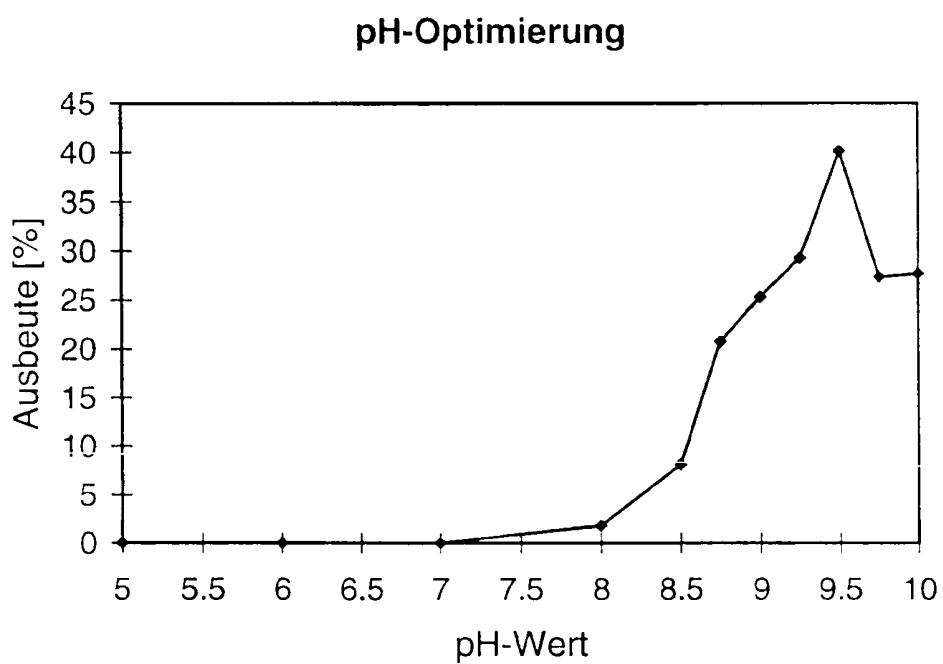


Fig. 2b

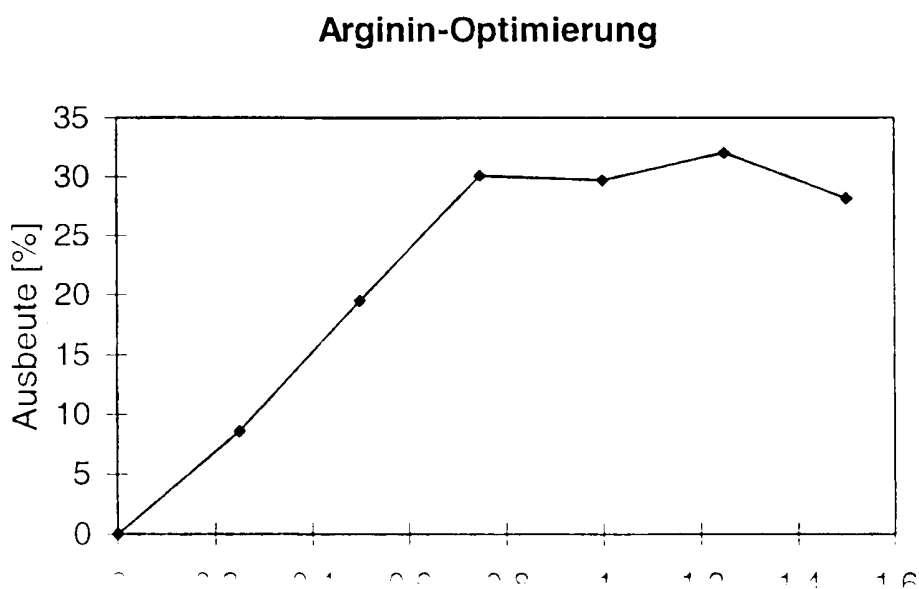


Fig. 2c

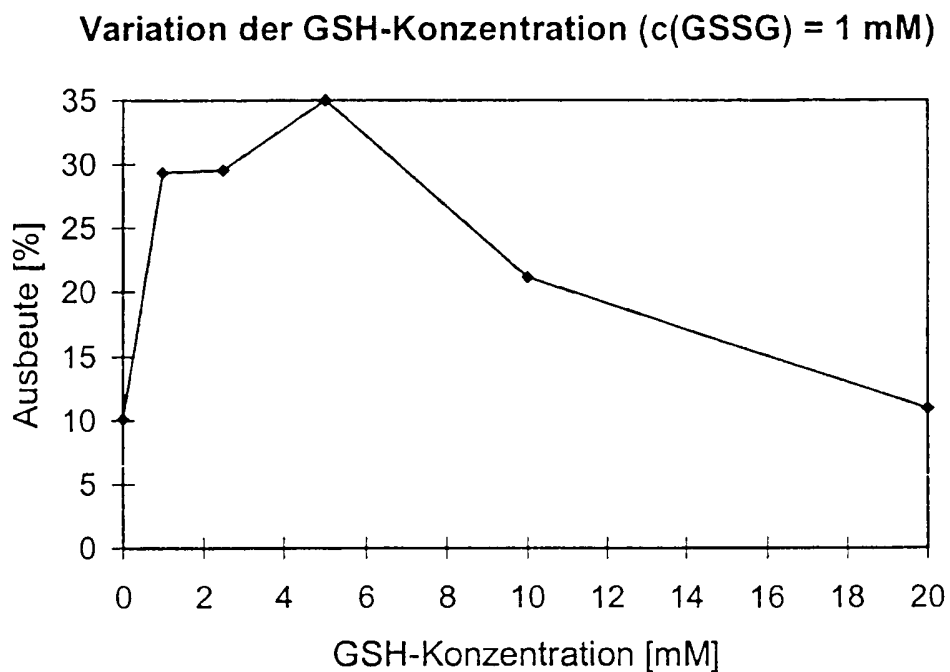


Fig. 2d

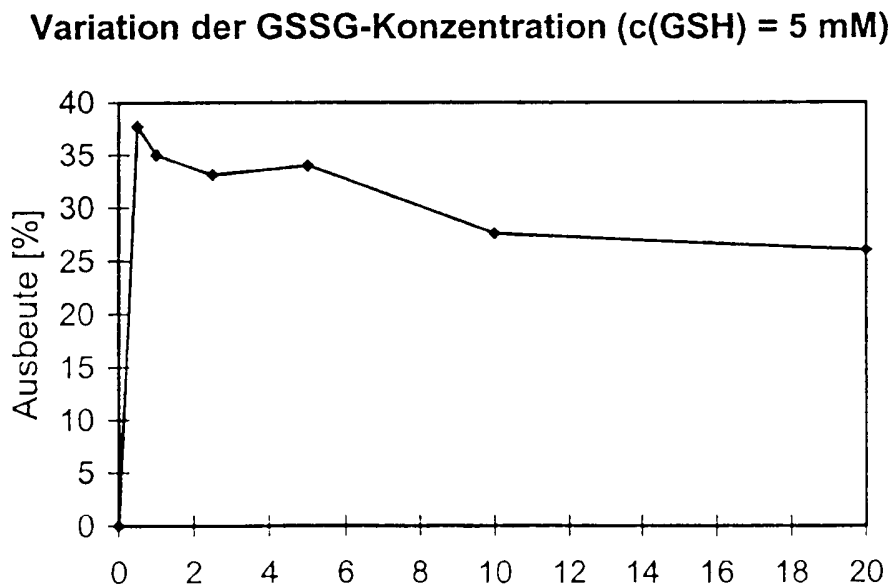


Fig. 2e

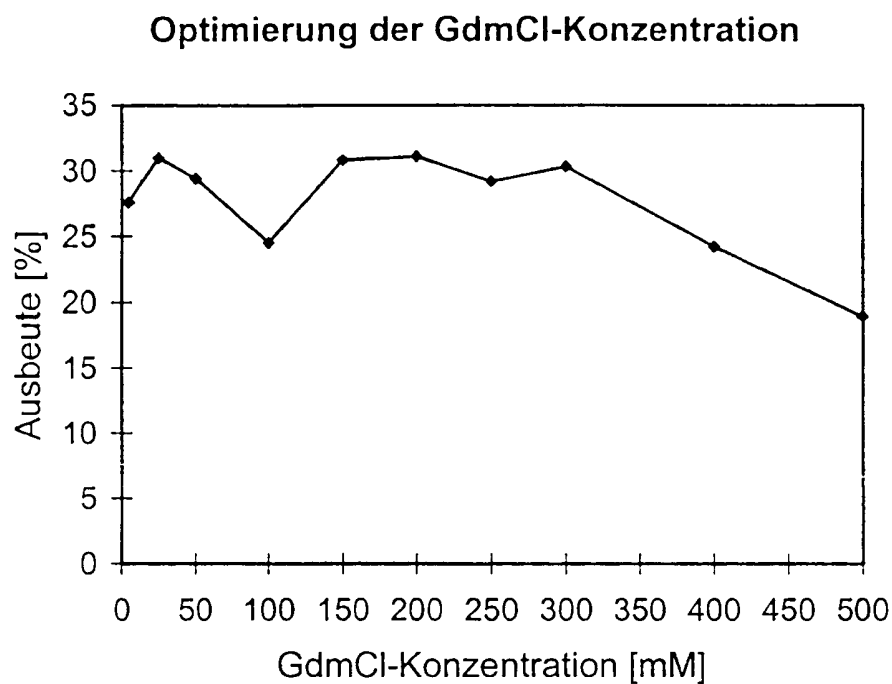


Fig. 2f

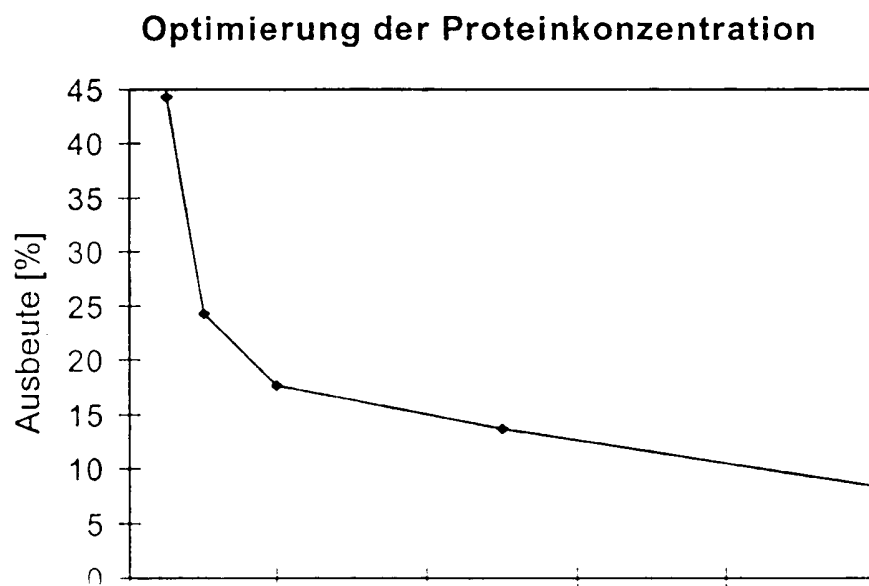


Fig. 3

Elutionsprofil der Reinigung von rh-proNGF an Poros 20 HS

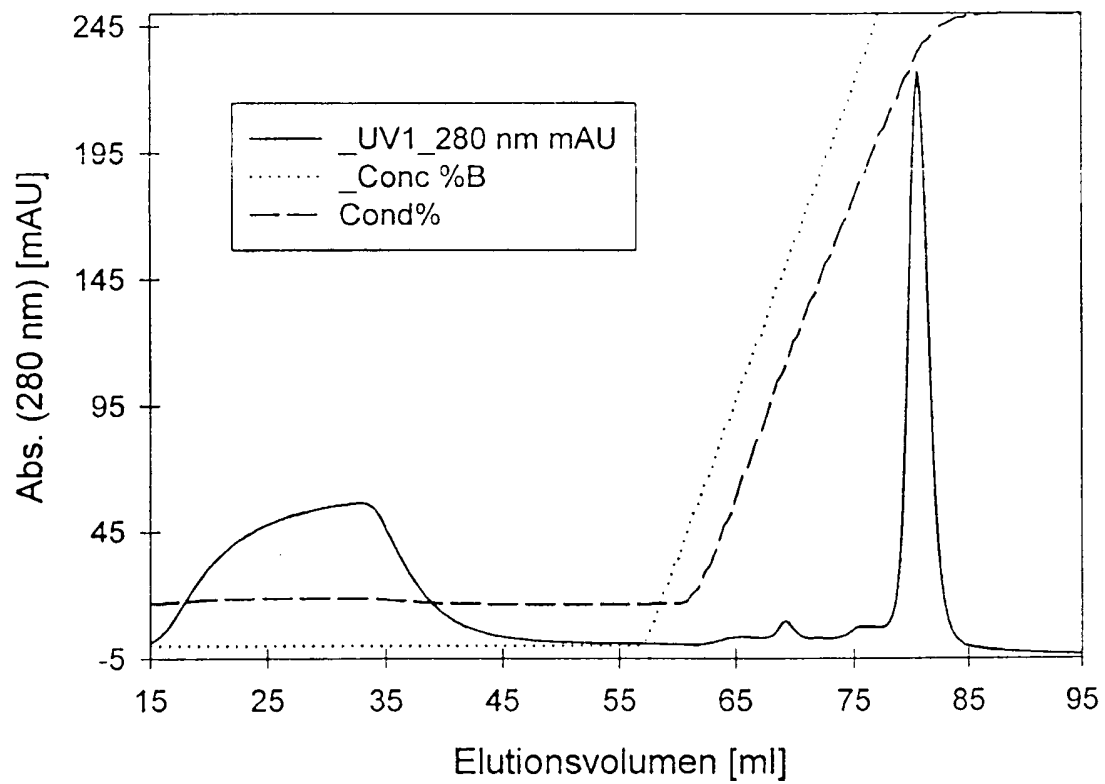


Fig. 4

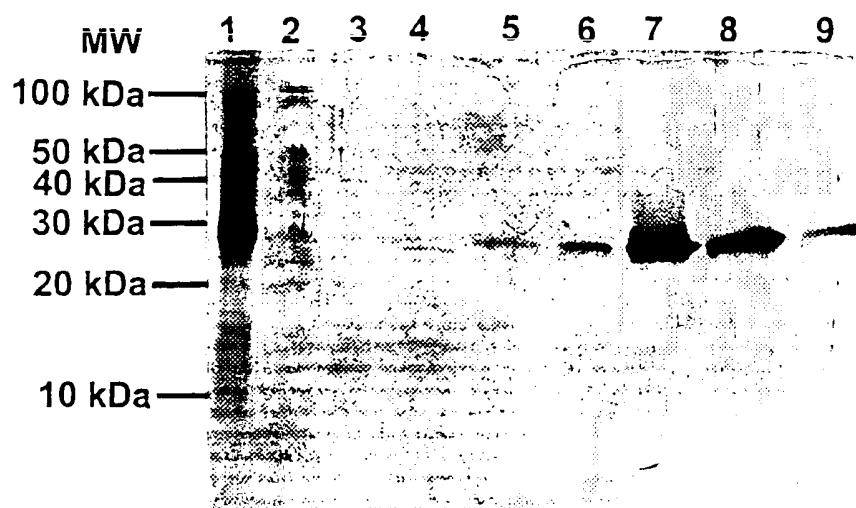


Fig. 5

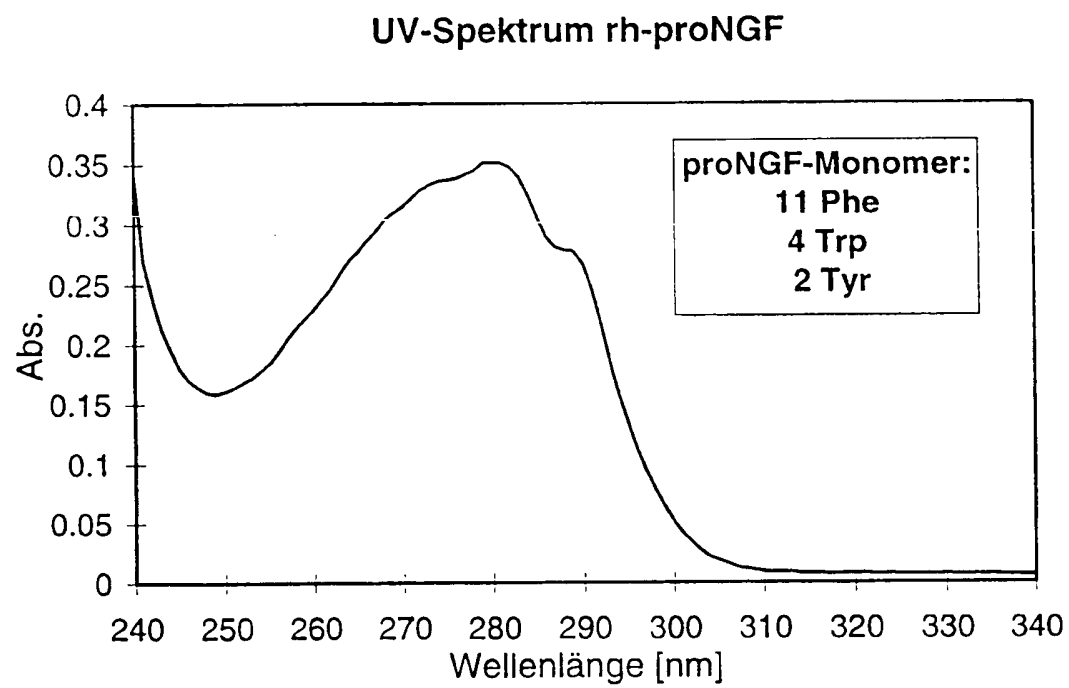


Fig. 6

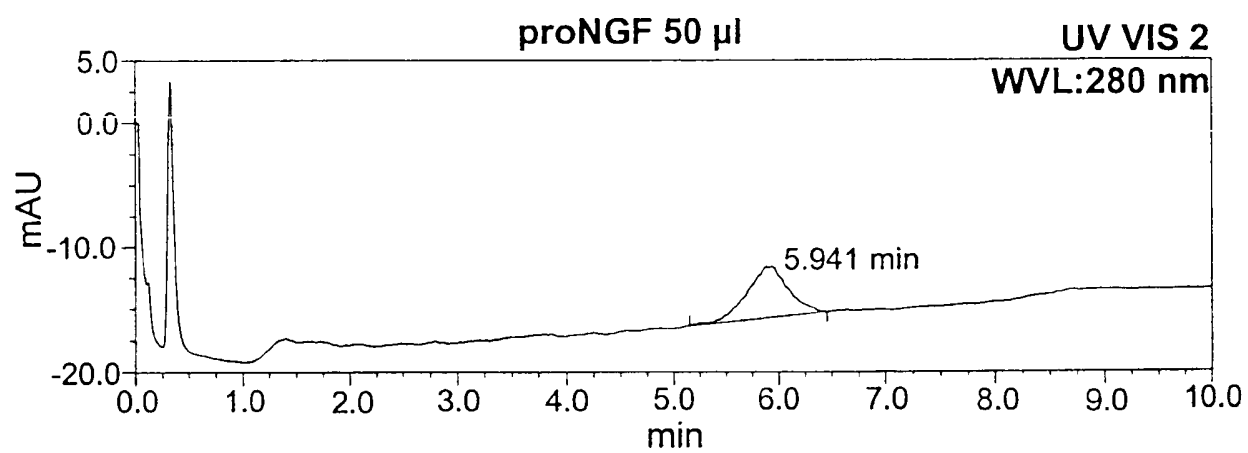


Fig. 7

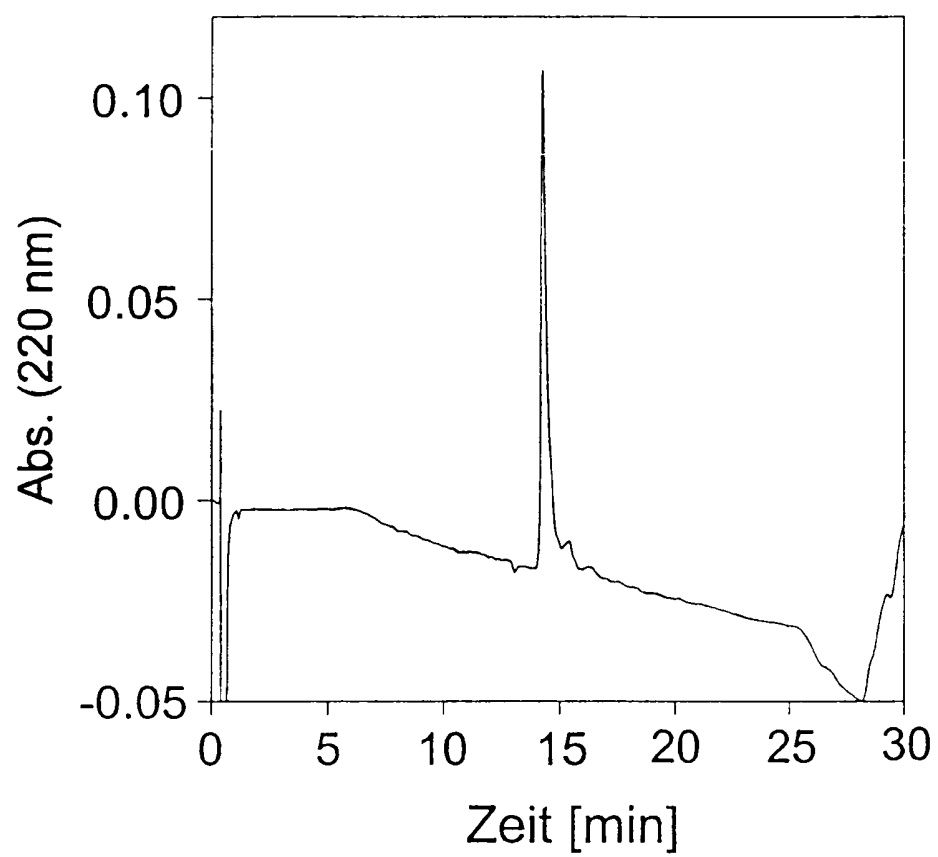
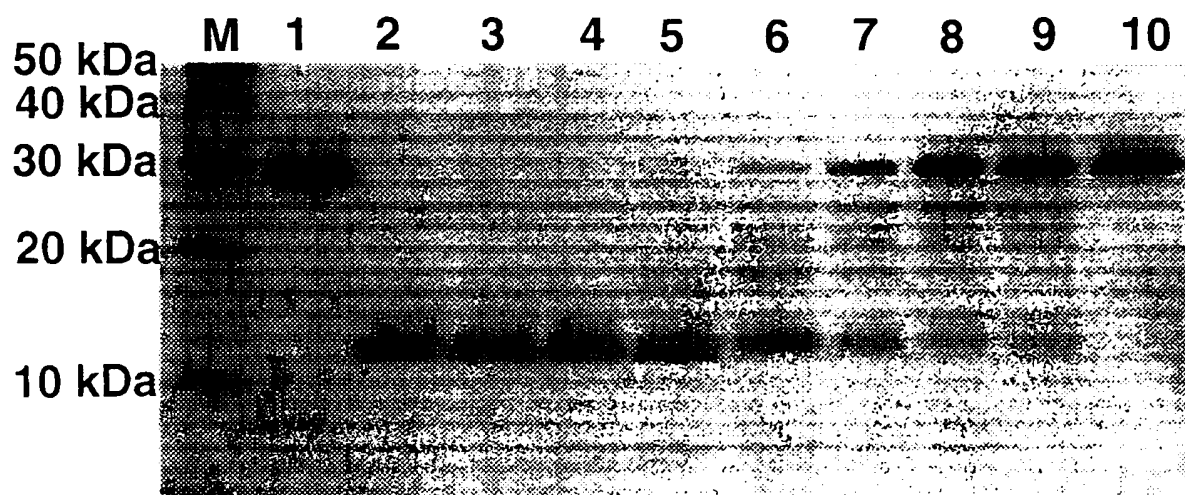


Fig. 8



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Rudolph, Prof. Dr. Rainer

<120> Verfahren zur Gewinnung von aktivem beta-NGF

<130> P11700

<140>

<141>

<150> EP 98119077.0

<151> 1998-10-09

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: desc =
Forward Primer - FwProNGF"

<400> 1

cggaattcca tatggaacca cactcagaga gc

32

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: desc =
Reverse Primer - RevNGF

<400> 2

cggatcctt atcatctcac agcctttcta ga

32

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(672)

<400> 3

atg gaa cca cac tca gag agc aat gtc cct gca gga cac acc atc ccc 48

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro

1

5

10

15

caa gtc cac tgg act aaa ctt cag cat tcc ctt gac act gcc ctt cgc 96

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg

20

25

30

aga gcc cgc agc gcc ccg gca gcg gcg ata gct gca cgc gtg gcg ggg 144

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly

35

40

45

cag acc cgc aac att act gtg gac ccc agg ctg ttt aaa aag cgg cga 192

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg

50

55

60

ctc cgt tca ccc cgt gtg ctg ttt agc acc cag cct ccc cgt gaa gct 240

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala

65

70

75

80

gca gac act cag gat ctg gac ttc gag gtc ggt ggt gct gcc ccc ttc 288

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe

85

90

95

aac agg act cac agg agc aag cgc tca tca tcc cat ccc atc ttc cac 336

Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His

100

105

110

agg ggc gaa ttc tcg gtg tgt gac agt gtc agc gtg tgg gtt ggg gat 384

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp

115

120

125

aag acc acc gcc aca gat atc aag ggc aag gag gtg atg gtg ttg gga 432

Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly

130

135

140

gag gtg aac att aac aac agt gta ttc aaa cag tac ttt ttt gag acc 480

Glu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr

Lys Cys Arg Asp Pro Asn Ser Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp

170

175

tca aag cac tgg aac tca tat tgt acc acg act cac acc ttt gtc aag 576
 Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys
 180 185 190

gcg ctg acc atg gat ggc aag cag gct gcc tgg cgg ttt atc cgg ata 624
 Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile
 195 200 205

gat acg gcc tgt gtg tgt gtg ctc tct aga aag gct gtg aga tga taa 672
 Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg
 210 215 220

<210> 4

<211> 222

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro
 1 5 10 15

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg
 20 25 30

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly
 35 40 45

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg
 50 55 60

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe
 85 90 95

Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His
 100 105 110

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp
 115 120 125

Glu Val Asn Ile [REDACTED] Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe [REDACTED] Glu Thr
145 150 155 160

Lys Cys Arg Asp Pro Asn Ser Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp
165 170 175

Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys
180 185 190

Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile
195 200 205

Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg
210 215 220

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/EP 99/07613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C07K14/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 544 293 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2 June 1993 (1993-06-02) cited in the application abstract page 3, line 45 -page 4, line 34 page 4, line 54 -page 5, line 23 page 6, line 24 -page 7, line 1 ---	1-7
X	EP 0 786 520 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 30 July 1997 (1997-07-30) abstract page 3, line 9 -page 4, line 23 page 5, line 16 -page 7, line 29 page 13, line 39,40 --- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of mailing of the international search report

Date of mailing of the international search report

Address for correspondence

European Patent Office, P.O. Box 5918 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epon,
Fax: (+31-70) 340-3016

Signature of the applicant

Macchia, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No.

T/EP 99/07613

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SUTER U. ET AL.: "Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, vol. 10, no. 9, 1991, pages 2395-2400, XP002095460 cited in the application abstract page 2399</p>	
A	<p>--- WO 97 28272 A (TECHNOLOGENE INC. (US); SGARLATO G.D.) 7 August 1997 (1997-08-07) page 27, line 24 -page 29, line 21 page 101, line 11 -page 106; example 6 -----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/07613

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0544293	A	02-06-1993	DE 4139000 A	03-06-1993
			AT 158814 T	15-10-1997
			DE 59208942 D	06-11-1997
			EP 0786520 A	30-07-1997
			JP 2637392 B	06-08-1997
			JP 9023883 A	28-01-1997
			JP 2611102 B	21-05-1997
			JP 6327489 A	29-11-1994

EP 0786520	A	30-07-1997	DE 4139000 A	03-06-1993
			AT 158814 T	15-10-1997
			DE 59208942 D	06-11-1997
			EP 0544293 A	02-06-1993
			JP 2637392 B	06-08-1997
			JP 9023883 A	28-01-1997
			JP 2611102 B	21-05-1997
			JP 6327489 A	29-11-1994

WO 9728272	A	07-08-1997	US 5935824 A	10-08-1999
			AU 1847497 A	22-08-1997
			EP 0910658 A	28-04-1999

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDEGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/12 7K14/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 544 293 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 2. Juni 1993 (1993-06-02) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3, Zeile 45 -Seite 4, Zeile 34 Seite 4, Zeile 54 -Seite 5, Zeile 23 Seite 6, Zeile 24 -Seite 7, Zeile 1 ---	1-7
X	EP 0 786 520 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE); LANG; BARTKE; NAUJOKS; RUDOLPH; STERN) 30. Juli 1997 (1997-07-30) Zusammenfassung Seite 3, Zeile 9 -Seite 4, Zeile 23 Seite 5, Zeile 16 -Seite 7, Zeile 29 Seite 13, Zeile 39,40 --- -/--	1-7



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 eponi
Fax (+31-70) 340-3016

Erfinder, der die Erfindung gemacht hat

Macchia, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH GEGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>SUTER U. ET AL.: "Two conserved domains in the NGF propeptide are necessary and sufficient for the biosynthesis of correctly processed and biologically active NGF"</p> <p>THE EMBO JOURNAL, Bd. 10, Nr. 9, 1991, Seiten 2395-2400, XP002095460 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 2399</p> <p>---</p>	
A	<p>WO 97 28272 A (TECHNOLOGENE INC. (US); SGARLATO G.D.) 7. August 1997 (1997-08-07) Seite 27, Zeile 24 -Seite 29, Zeile 21 Seite 101, Zeile 11 -Seite 106; Beispiel 6</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

/EP 99/07613

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0544293 A	02-06-1993	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0786520 A	30-07-1997
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994

EP 0786520 A	30-07-1997	DE 4139000 A	03-06-1993
		AT 158814 T	15-10-1997
		DE 59208942 D	06-11-1997
		EP 0544293 A	02-06-1993
		JP 2637392 B	06-08-1997
		JP 9023883 A	28-01-1997
		JP 2611102 B	21-05-1997
		JP 6327489 A	29-11-1994

WO 9728272 A	07-08-1997	US 5935824 A	10-08-1999
		AU 1847497 A	22-08-1997
		EP 0910658 A	28-04-1999
